

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-28379

(43) 公開日 平成9年(1997)2月4日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
// (C 1 2 N 15/09				
C 1 2 R 1:01)				

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 3 頁)

(21) 出願番号 特願平7-205062

(22) 出願日 平成7年(1995)7月20日

(71) 出願人 000003953

日東化学工業株式会社

東京都千代田区丸の内1丁目5番1号

(72) 発明者 水無 渉

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日

東化学工業株式会社中央研究所内

(72) 発明者 湯 不二夫

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日

東化学工業株式会社中央研究所内

(54) 【発明の名称】 環状プラスミド

(57) 【要約】

【課題】 ロドコッカス属宿主-ベクター系におけるベクターの開発。

【解決手段】 大きさが約3.6kbであり、制限酵素切断部位数が BamHI:1、BglIII:1、ClaI:1、PstI:1、PvuII:2、SacI:1であることを特徴とするロドコッカス属に属する微生物由来の環状プラスミド。

【効果】 本発明の環状プラスミドは工業的に有用な宿主-ベクター系におけるベクターとして有用である。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 大きさが約3.6kbであり、制限酵素切断部位数が BamHI:1、BglII:1、ClaI:1、PstI:1、PvuII:2、SacI:1であることを特徴とするロドコッカス属に属する微生物由来の環状プラスミド。

【請求項2】 微生物がロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) IFO 12320 である請求項1記載の環状プラスミド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は新規なプラスミドに関し、さらに詳しくはロドコッカス属に属する微生物に由来する新規なプラスミドに関する。ロドコッカス属に属する微生物は、ニトリル類の代謝に関与する酵素を生産することやPCB（ポリ塩化ビフェニル）等の分解に関与する酵素を生産すること、さらには、排水処理に用いられるようなバイオサーファクタントを生産することなどの非常に多様な性質を示すことから、工業的に極めて有用な微生物であることが知られている。

## 【0002】

【従来の技術】しかしながら、ロドコッカス属に属する菌株については、これらの微生物を宿主とするに適したベクターの開発は遅れており、ロドコッカス属においてプラスミドの見い出された株は、ロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) H13-A 株(J. Bacteriol. 170, 63 8-645(1988))、本発明者らが先に見出したロドコッカス ロドクロウス (*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC 4276 株等 (特開平4-148685号公報参照) およびロドコッカス ロドクロウス (*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC4001 株 (特開平4-330287号公報参照) など、僅か数株にすぎない。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】特に、工業的にこれら宿主-ベクター系を用いる場合には、組換えDNA微生物の安全性の面でセルフクローニング系で用いることが望ましいと考えられるが、現在のところ、このセルフクローニング系としては、ロドコッカス ロドクロウス (*Rhodococcus rhodochrous*) しか利用できないという問題点があった。そのため、ロドクロウス種以外のロドコッカス属に属する菌株から、工業的に利用し得る微生物を育種改良するための新しいベクターの開発が強く要望されていた。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ロドコッカス属に属する菌株を用いて工業的に有用な宿主-ベクター系を開発すべく鋭意研究を行った結果、ロドコッカス属に属する微生物から工業的に有用な宿主-ベクター系におけるベクターとして利用可能な新規な環状プラスミドを見い出し、本発明を完成した。

【0005】すなわち、本発明は、大きさが約3.6kbで

2

あり、制限酵素切断部位数が BamHI:1、BglII:1、ClaI:1、PstI:1、PvuII:2、SacI:1であることを特徴とするロドコッカス属に属する微生物由来の環状プラスミド、である。

## 【0006】

【発明の実施の形態】本発明のプラスミドは、具体的には、例えば、ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) IFO 12320株から得ることができ、大きさが約3.6kbで、且つ表1に示す制限酵素に対する分解特性を有する新規な環状プラスミドである。以下、このプラスミドをpRC020と称する。

## 【0007】表1

制限酵素	切断部位数	生成断片のサイズ(kb)
BamHI	1	3.6
BglII	1	3.6
ClaI	1	3.6
PstI	1	3.6
PvuII	2	2.75, 0.85
SacI	1	3.6

## 20 【0008】

【実施例】次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発明の技術的範囲を限定するものではない。

## 【0009】実施例1

## プラスミドの分離精製

ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) IFO 12320株を100mlのMY培地（ポリペプトン0.5%、バクトイーストエキス0.3%、マルツエキス0.3%、グルコース1%）に植菌した。24時間培養した後に終濃度2%となるように滅菌した20%グリシン溶液を添加し、さらに24時間培養した。その後、遠心分離により菌体を回収し、菌体を40ml TE S (10mM Tris-HCl (pH8) - 10mM NaCl - 1mM EDTA) 緩衝液で洗浄後、11mlの50mM Tris-HCl (pH8) - 12.5%シュークロース - 100mM NaCl - 1mg/ml リゾチームに懸濁し、37℃にて3時間振盪した。これに1mlの10% SDSを加え室温で穏やかに1時間振盪し、さらに1mlの5M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.2) を添加し水中で1時間静置した。その後、4℃にて10,000xg、1時間遠心し上清を得た。これに5倍量のエタノールを加え、-20℃で30分静置した後、10,000xg、20分間遠心した。沈澱物を30mlの70%エタノールで洗浄した後、1mlのTE緩衝液に溶解しプラスミド画分を得た。これを0.7%アガロースゲル電気泳動に供し、ゲルを臭化エチジウムで染色することによりプラスミドの存在を確認した。

## 【0010】プラスミドの分子量測定

上記のように調製したプラスミドの一部を0.7%アガロースゲル電気泳動に供した。この際、サイズマーカー

3

4

として大腸菌プラスミドpUC18、pUC118、pTrc99A(各々2.69kb、3.16kb、4.17kb)を同時に泳動した。ロドコッカス エリスロポリス(Rhodococcus erythropolis) IF012320株から得られたプラスミドはpRC020と命名され、アガロースゲル電気泳動から求められた大きさは約3.6kbであった。

#### 【0011】各種制限酵素による切断特異性

上記のように調製したプラスミドの一部を各種制限酵素と反応させ、反応終了後、反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動および5%アクリルアミドゲル電気泳動により分析した。サイズマーカーとしてはラムダファージDNAのHindIII消化物およびPstI消化物を用い、プラスミドの各制限酵素断片のサイズを算出した。pRC020は表2のような制限酵素切断特性を示した。

#### 【0012】表2

制限酵素	切断部位数	生成断片のサイズ(kb)
BamHI	1	3.6
BglIII	1	3.6

\*20

*ClaI	1	3.6
EcoRI	0	—
HindIII	0	—
PstI	1	3.6
PvuII	2	2.75, 0.85
SacI	1	3.6
ScaI	0	—
SmaI	0	—
SphI	0	—
SpII	0	—
XhoI	0	—

#### 【0013】

【発明の効果】本発明の環状プラスミドは工業的に有用な宿主-ベクター系におけるベクターとして有用である。

#### 【0014】

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のプラスミドpRC020の制限酵素切断地図。

【図1】

